

## Propuesta de un nuevo modelo microquirúrgico para el estudio de la endometriosis inducida en rata Wistar. Resultados Preliminares

P. González Ramos<sup>1</sup>, P. Royo Manero<sup>1,2</sup>, C. Pastor Oliver<sup>1</sup>, E. Calleja Aguayo<sup>1</sup>, A. De Martino<sup>1</sup>, J. Godino<sup>1</sup>, P. Bejarano Lasunción<sup>1</sup>, F. J. Manero<sup>1</sup>, A. Pecondón<sup>1</sup>, B. Vicente<sup>1</sup>, J. Gracia Romero<sup>1</sup>, J. Ortega<sup>1</sup>, M. García Manero<sup>2</sup>, J. L. Alcázar Zambrano<sup>2</sup>, R. González de Agüero<sup>1</sup>, E. Fabre González<sup>1</sup>, G. López García<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Zaragoza

<sup>2</sup> Universidad de Navarra

### Correspondencia:

Manuel García Manero  
Departamento de Ginecología y Obstetricia  
Clínica Universidad de Navarra  
31008 Navarra  
(mgmanero@unav.es)

### Resumen

El desconocimiento actual sobre la patogenia de la endometriosis y las devastadoras consecuencias que conlleva esta enfermedad para las mujeres en edad reproductiva, han sido las grandes promotoras de los esfuerzos de los investigadores en los últimos años. La implicación patogénica del sistema inmunológico, así como de los procesos neoangiogénicos ha abierto una gran vía de conocimiento sobre las teorías clásicas conocidas desde principios del siglo xx. Todo ello, pasa por la investigación experimental de la endometriosis, en modelos animales, con sistemas de inducción de la enfermedad. A continuación explicamos los primeros resultados de un nuevo modelo experimental de autogeneración de endometriosis en rata Wistar ("PGR1-HotDog"), creado con una finalidad, el conocimiento de las fases más precoces de la enfermedad.

**Palabras clave:** Endometriosis. Modelos animales de endometriosis

### Summary

The current knowledge status on the pathogenesis of endometriosis as well as devastating consequences of disease evolution in women's reproductive health, have promoted researchers advances in a great manner during last years. The immunologic and neangiogenesis systems implication have opened new ways of knowledge over classic theories from the beginning of the xx century. The experimental research, using animal induction models. Below we explain the first steps a new induction model ("PGR1-HotDog"), based on Wistar rats using a new disease autogeneration system, created for the study of the early stages of the endometriosis.

**Key words:** Endometriosis, Animals model's of Endometriosis

### Introducción

Desde las primeras descripciones relativas a la endometriosis (llevadas a cabo por Sampson en 1927) realizadas a principios del siglo pasado, la fisiopatología de esta enfermedad no ha sido totalmente clarificada. Por ello, y durante más de una centuria, se han ido sucediendo diversos estudios de inducción experimental llevados a cabo en animales. De hecho, fue Jacobson en 1922 el primer investigador que propuso la realización de un autotransplante intraabdominal de tejido endometrial en hembra de conejo como primer modelo experimental. Han sido muchos los modelos descritos hasta la fecha, empleándose diferentes tipos de animales (cánidos, primates y roedores, entre otros), siendo estos últimos los más utilizados, especialmente desde que Jones describió en 1984 un modelo experimental para la inducción de endometriosis en ratas Wistar suturando láminas de endometrio al peritoneo de las ratas. Un año más tarde, Vernon y Wilson, añadieron miometrio a estas láminas endometriales, constituyendo el modelo estándar actual para el estudio de la endometriosis experimental en rata Wistar<sup>1</sup>.

Por otro lado, la endometriosis experimental en rata Wistar provoca alteraciones inmunológicas similares en algunos aspectos,

a las observadas en humanos, hecho que hace el empleo de estos animales óptimo para la experimentación<sup>1,2</sup>.

Desde finales del siglo xx, se ha intentado demostrar el grado de implicación del sistema inmune en la patogenia de la endometriosis<sup>1</sup>. Los principales hallazgos incluyen un incremento en el número y actividad de los macrófagos, aumento de los factores quimiotácticos para estas células, elevado nivel de citocinas y factores de crecimiento que pueden ser responsables de la iniciación, mantenimiento y progresión de la enfermedad<sup>3,4</sup>.

Los macrófagos peritoneales presentan alteración en su función por disminución de la capacidad para adherir y destruir las células endometriales. (citar Noriega) Dentro del grupo de citocinas el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) ha llamado poderosamente la atención en la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes. El TNF $\alpha$  es producido por los neutrófilos, linfocitos activados, las células natural killer (NK) y los macrófagos. Numerosos estudios han demostrado que los niveles de TNF $\alpha$  están elevados en el líquido peritoneal de las pacientes con endometriosis y que estas elevadas concentraciones se correlacionan con el estadio de la enfermedad<sup>3,4,5</sup>.

Esta citokina tiene dentro sus funciones tres primordiales: estimular la producción de otras citocinas proinflamatorias (como

IL1, IL6 y IL8), es un potente inductor de la neovascularización en el peritoneo (mediado por el factor de crecimiento vascular endotelial o VEGF) y fomenta la proliferación y adhesión de las células endometriales<sup>2,4</sup>. Además, se han implicado muchas otras interleukinas y mediadores en la patogenia de la endometriosis, destacando el papel de la proteína quimiotáctica de los monocitos – 1 (MCP-1) como productora de la migración y activación de monocitos en el contexto de enfermedades inflamatorias tanto agudas como crónicas, como es el caso de la endometriosis<sup>2-7</sup>.

Creemos que el modelo clásico adolece de algunas deficiencias que podrían ser cruciales a la hora de entender la fisiopatología de la endometriosis, fundamentalmente las referidas al estudio de la enfermedad en sus fases más precoces, al ser establecida quirúrgicamente una lesión peritoneal de inicio. Este hecho nos llevó a idear un sistema de autogeneración de endometriosis ("implante" PGR1-HotDog) creado microquirúrgicamente en ratas Wistar, evitando así la yatrogenia del modelo clásico, propuesto por Vernon y Wilson y poder evaluar la endometriosis de una manera mas "fisiológica".

## Material y métodos

### Animales

Para la realización del experimento, se emplearon diez ratas Wistar hembra (200 gramos, 2.5 meses de edad). Los animales fueron proporcionados y estabulados por el Laboratorio Animal de la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza.

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo siguiendo un protocolo de actuación autorizado por la Comisión de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (número de registro PI30/07).

### Procedimientos microquirúrgicos

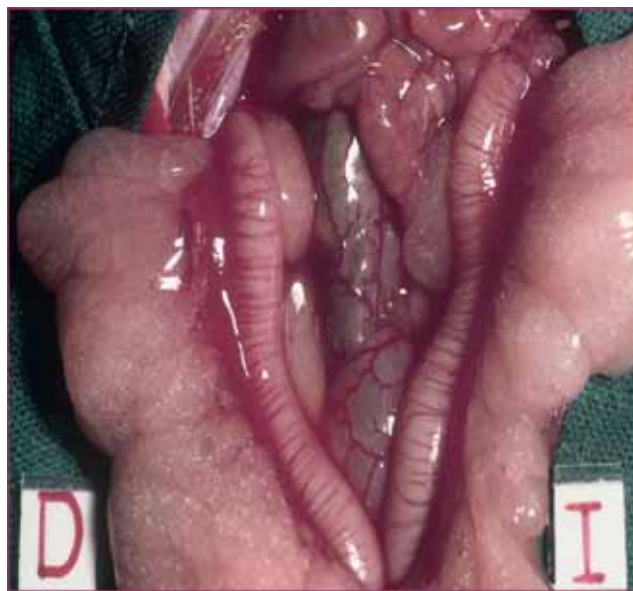
#### Primera laparotomía

Una vez que la rata es anestesiada, se le asigna un número de identificación y se procede a la realización de una laparotomía media infraumbilical de unos 3 cm de longitud. En este momento se realiza un primer lavado (basal) peritoneal con 5 ml de suero fisiológico, para análisis inmunológico (determinaciones basales de MCP-1, TNF  $\alpha$ , VEGF, IFN  $\gamma$ , IL1 $\alpha$ , IL6, e IL10).

Tras conseguir una adecuada exposición de útero de la rata Wistar, se aísla el segmento medio del cuerno izquierdo uterino, en dos secciones a 15 mm y 20-22 mm del cuerpo uterino, demarcando un territorio de 5-7 mm con el que se fabricará el implante (Figura 1).

La superficie antimesentérica del territorio implante es seccionada longitudinalmente en todo su espesor, consiguiendo una exposición total de la mucosa endometrial (Figuras 2 y 3). Entonces, los cabos de las dos porciones remanentes de cuerno uterino izquierdo son anastomosadas termino-terminalmente mediante una sutura seromuscular de 8/0 con 5-6 puntos (Figura 4). Dicha anastomosis, es cubierta a su vez por la mucosa endometrial del tercio medio del cuerno izquierdo uterino ("al mismo modo que una salchicha es envuelta por el pan en un perrito caliente" en palabras de su autor). Los dos bordes (antimesentéricos) de esta cobertura, son suturados entre si con tres

**Figura 1.** Exposición de los dos cuernos uterinos derecho (D) e izquierdo (I)



**Figura 2.** Disección borde antimesentérico del segmento medio de cuerno izquierdo



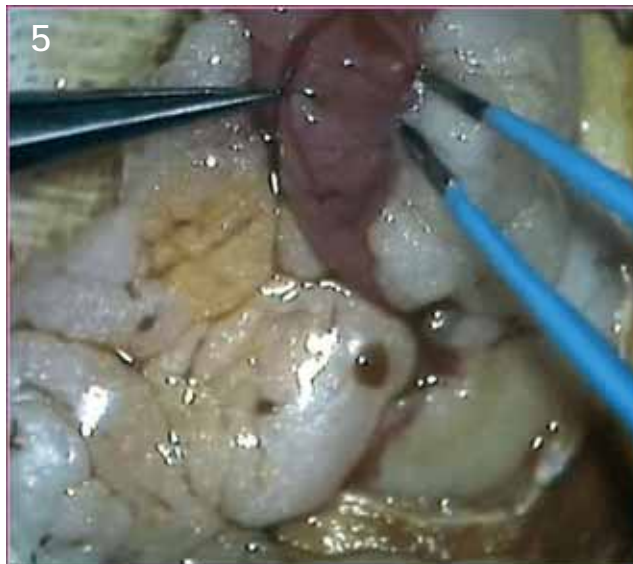
puntos seromusculares de 8/0 evitando una compresión excesiva que pudiera dañar el contenido envuelto. A la par, se electrocoagula la vascularización contenida en el meso del implante exclusivamente, evitando dañar la vascularización del resto del cuerno izquierdo restante, constituyéndose así el implante en sus condiciones definitivas para el estudio (Figura 5).

Finalmente, la laparotomía media es cerrada con sutura continua de 3/0 para la fascia y 5-6 puntos de seda de 3/0 para la piel (Figura 6).

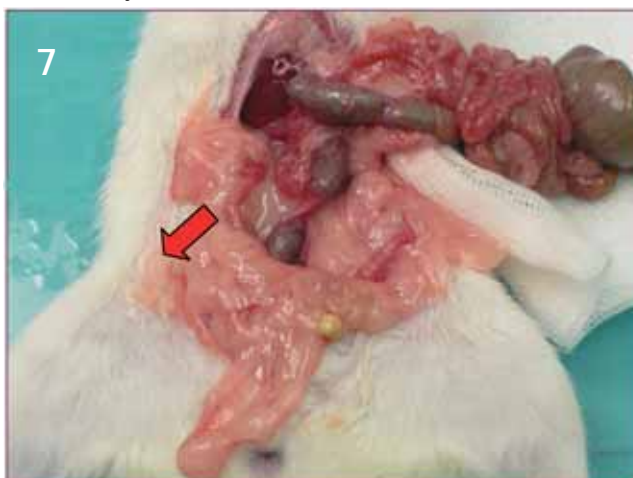
**Figura 3.** Pinza negra sujetando un cabo de cuerno izquierdo biseccionado y pinza blanca sujetando segmento medio de cuerno izquierdo seccionando longitudinalmente en dos hojas



**Figuras 4 y 5.** Anastomosis de cabos distales de cuerno izquierdo y cubiertos por las dos hojas del segmento medio del cuerno uterino izquierdo, como "un pan envuelve a una salchicha en un "perrito caliente"



**Figuras 7 y 8.** Focos endometriósicos ("vesículas amarillas") señalados con flecha roja





**Figura 9.** Adherencias sobre intestino y grasa mesometrial



### Segunda laparotomía

Ocho semanas más tarde, cada rata es relaparotomizada de nuevo, realizándose un nuevo lavado peritoneal con suero fisiológico (del mismo modo y mandándose las segundas muestras a inmunología también (determinaciones secundarias de MCP-1, TNF $\alpha$ , VEGF, IFN  $\gamma$ , IL1 $\alpha$ , IL6, e IL10). Una vez se visualiza el implante, se chequea su aspecto macroscópico (coloración, presencia de adherencias, necrosis o lesiones endometriósicas) y es a continuación extraído. A su vez, se revisa toda la cavidad abdominal y se toman múltiples biopsias para finalizar realizando una histerectomía con doble anexectomía, cistectomía y resección intestinal para estudio histopatológico con hematoxilina-eosina. Finalmente, se procede al sacrificio animal con sobredosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal.

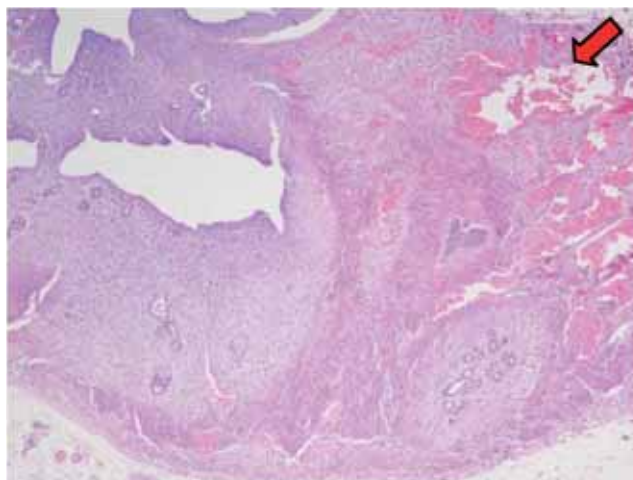
Los lavados peritoneales fueron realizados con 10 ml de suero fisiológico, siendo posteriormente centrifugados a 1.200 r.p.m durante 7 minutos para eliminar células redundantes. El sobrenadante se congela a - 70o C hasta que la muestra es procesada. Las concentraciones en líquido peritoneal de IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-10, IFN  $\gamma$ , MCP-1, TNF  $\alpha$  y VEGF se determinaron mediante análisis multiplex usando la tecnología xMAP®. Para ello se empleó el MILLIPLEX map kit para citoquinas de rata (Millipore corporation, Billerica, MA, USA). Las muestras se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de los resultados se realizó en un equipo LABSCAN 200 (Luminex, Austin, TX, USA).

### Resultados y discusión

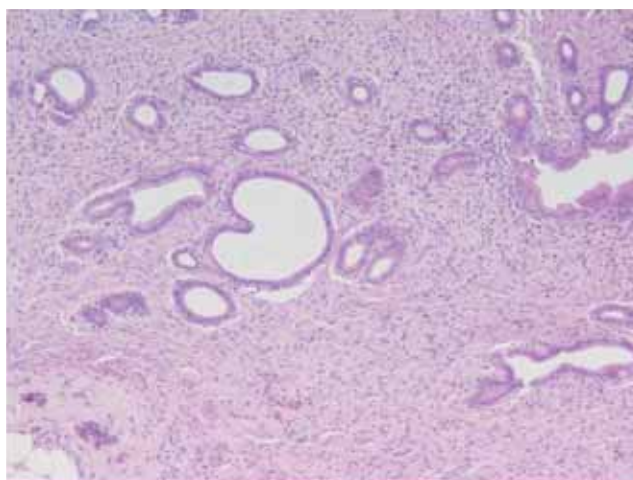
Aunque el presente estudio constituye un análisis preliminar de un nuevo modelo experimental propuesto para la inducción de endometriosis, nos ofrece ya algunos datos que apuntan positivamente sobre su validez y pertinencia, datos que deberán ser corroborados en próximos estudios, actualmente ya en fase de realización.

Como primer hallazgo relevante, se pudo comprobar

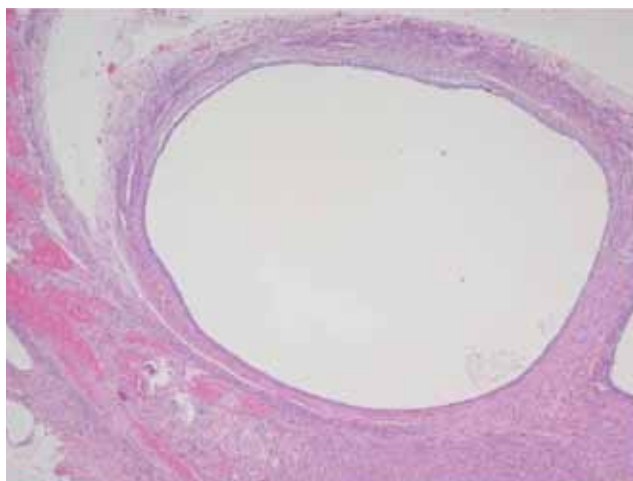
**Figura 10.** Áreas quísticas en implante (adenomiosis) con profusa neovascularización, señaladas con flecha roja



**Figura 11.** Detalle de áreas quísticas entre fibras musculares del implante (adenomiosis)



**Figura 12.** Zona quística de contenido estral con neovascularización en su periferia



**Tabla 1.** Distribución de datos procedentes de los dos lavados peritoneales (basal y tras implante). Como se puede observar solamente figuran aquellas determinaciones cuyos valores finales pudieron ser validados

	N	Mean	SD	Min.	Max
mcp1 basal	7	155,3857	107,57125	53,90	325,50
tnfalfabasal	10	78,4260	44,76443	7,50	137,20
VEGFbasal	7	113,6429	102,78007	22,40	253,00
mcp1implanted	6	264,8167	43,86923	227,70	344,70
tnfalfaimplanted	6	167,1750	35,92147	122,65	210,40
VEGFimplanted	6	327,7167	141,85196	115,80	527,30

**Tabla 2.** Diferencias significativas demostradas para los valores de MCP1, TNFalfa y VEGF medidos antes y después del implante (Test Wilcoxon para muestras pareadas)

	mcp1implanted - mcp1 basal	t nalfaimplanted - tnalfabasal	VEGFimplanted - VEGFbasal
Z	- 1,992	-2,201	-2,023
Sig. asintót. (bilateral)	,046	,028	,043

(ocho semanas después de la primera laparotomía en todos los animales), la revascularización, viabilidad y funcionalidad del implante, tanto en su aspecto macroscópico (Figuras 7-9) como microscópico (Figuras 10-12). Los fenómenos inflamatorios generados por el implante fueron constatados en forma de adherencias múltiples a los órganos vecinos, fundamentalmente a la grasa mesometrial y al intestino circundante (Figura 9). Asimismo, la presencia de "vesículas amarillas", (diseminadas por el peritoneo y órganos adyacentes) fue el hallazgo macroscópico más frecuentemente encontrado (Figuras 7 y 8). Dichas vesículas consisten en acúmulos quísticos de líquido estral, generados por el implante y que a lo largo de los siguientes ciclos, van constituyéndose en verdaderos quistes cuyo contenido va aplanando extrínsecamente su cápsula (Figura 12).

El presente hallazgo fue previamente descrito e interpretado (en otros modelos experimentales en roedores) por Ortega J como implantes endometriósicos<sup>8,9</sup>. Además, estos acúmulos de líquido estral se localizaron también en el espesor del implante de algunas ratas (la parte que correspondería "al pan que recubre la salchicha") configurados en una disposición quística rodeada de profusa neovascularización y siendo sugestivamente interpretados como áreas de adenomiosis (Figuras 10 y 11).

Un hallazgo inesperado e interesante, fue encontrar afectación ovárica bilateral en algunos de los especímenes de estudio, un hallazgo no usualmente descrito en ratas. Estos órganos se encuentran recubiertos por la denominada "bursa ovárica" que evita, en condiciones normales, la fuga de líquido estral hacia el ovario y peritoneo, evitando así la diseminación de endometriosis<sup>10-14</sup>.

Con respecto a las determinaciones analíticas extraídas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos lavados peritoneales (basal y secundario) para MCP-1, TNF  $\alpha$  y VEGF. Datos que concuerdan con los hallados la literatura y con los hallazgos patológicos, y por tanto, hechos que apoyan la presencia de endometriosis inducida en las ratas con el modelo propuesto (Tablas 1 y 2)<sup>2-7, 15-17</sup>.

## Conclusión

Los primeros datos obtenidos del estudio, revelan al modelo experimental PGR1- HotDog como un sistema capaz de generar endometriosis de manera autónoma en ratas Wistar de una manera más fisiológica que los modelos clásicos. Al ser creado quirúrgicamente, se tiende a minimizar la yatrogenia que conlleva la realización de un procedimiento invasivo sobre el estudio de una patología como la endometriosis y, secundariamente, la influencia del modelo sobre el estudio de sus fenómenos y mediadores inflamatorios, frente a modelos más invasivos, como el clásico, en espera de los resultados definitivos.

## Bibliografía

1. Ramos Maestre, MJ. Efectos del bloqueo del Tnf-alfa en la endometriosis experimental en rata Wistar.[tesis doctoral]. Elche. Universidad Miguel Hernández de Elche; 2003.
2. Noriega J, Falcone T, Bedaiwy M. Nuevos conceptos en la patogénesis y tratamiento de la endometriosis asociada a dolor. MEDUNAB 2003; 6(16): 39-45.
3. Umezawa M, Sakata C, Tanaka N, Kudo S, Tabata M, Takada K, Ihara T, Sugamata M. Cytokine and Chemokine expression in a rat endometriosis similar to that in human endometriosis. Cytokine 2008; 43:105-109.
4. Madhusudan S, Muthuramalingam SR, Braybrooke JP, Wilner S, Kaur K, Han C et al. Study of Etanercept, a Tumor Necrosis Factor - Alpha Inhibitor, in Recurrent Ovarian Cancer. J Clin Oncol 2005;23(25):5950-9.
5. Lin YJ, Lai MD, Lei HY, Wing LY. Neutrophils and Macrophages Promote Angiogenesis in the Early Stage of Endometriosis in a Mouse Model. Endocrinology 2005;147(3):1278-86.
6. Shakiba K, Falcone T. Tumour necrosis factor- $\alpha$  blockers: potential limitations in the management of advanced endometriosis? A Case Report. Hum Reprod 2006;21(9):2417-2420.
7. Oktem M, Esinler I, Eroglu D, Haberal N, Bairaktar N, Zeineloglu H. High-dose atorvastatin causes regression of endometriotic implants: a rat model. Hum Reprod 2007;22(5):1474-80.
8. Ortega J. Comparación de dos técnicas para inducir la endometriosis experimental en la rata. Clin. Inv. Gin. Obst. 21(2), 54-59, 1994.

9. Ortega J. Receptor concentrations for estradiol and progesterone in surgically induced endometriosis in the rat. Eur. J. Obstet. Gynecol. Repr. Biol. 54, 123-126, 1994.
10. Ortega J, González PJ. Valoración de una técnica personal de histerografía en la rata, con 460 casos. Progresos de Obstetricia y Ginecología. Vol. XXXII; 70 pag. 388 - 394. 1989.
11. González PJ, Ortega J, Romeo P, Usón J., Perez-Lopez, F. Rotación de segmentos uterinos de un cm de longitud en la rata Wistar: Efectos sobre la gestación y el parto. Progresos de Obstetricia y Ginecología. Vol. 32; 89 pag. 411 - 417. 1989.
12. González PJ, Ortega J, Romeo P, Usón J, Perez-Lopez, F. Reproducción en la rata Wistar tras la rotación del cuerno uterino izquierdo. Acta Ginecológica, Vol. XLVI; 10, pag. 467 - 472. 1989.
13. González PJ, Ortega J, Romeo P, Usón J, Valer J. Evolución histológica de los primeros 35 días de una anastomosis en el útero de la rata. Gine Dips. Nº 9; pag. 446 451. 1989.
14. Panay N. Advances in the medical Management of endometriosis. BJOG 2008;115:814-17.
15. García-Manero M, Alcazar JL, Toledo G. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and ovarian endometriosis: correlation between VEGF serum levels, VEGF cellular expression, and pelvic pain. Fertil Steril. 2007 Aug;88(2):513-515.
16. Alcázar JL, García-Manero M. Ovarian endometrioma vascularization in women with pelvic pain. Fertil Steril 2007;87:1271-6.
17. González P et al. Cirugía Laparoscópica Ginecológica en coneja utilizada como modelo animal quirúrgico experimental. Progresos de Obstetricia y Ginecología 5, 301-306 Vol. 51. Mayo de 2008.

# Formación de Posgrado en Nutrición y Salud

## Cursos de Posgrado

### Curso Superior de Alimentación y Salud (Título Propio de la Universidad de Navarra)

#### CURSOS DE POSGRADO A DISTANCIA

- ALIMENTACIÓN HOSPITALARIA
- NUTRICIÓN, DIETÉTICA Y DIETOTERAPIA
- ALIMENTACIÓN DE LAS PERSONAS MAYORES
- NUTRITION AND OBESITY
- NUTRICIÓN Y SALUD PÚBLICA
- ALIMENTOS: COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES
- NUTRICIÓN Y OBESIDAD
- NUTRICIÓN EN LA INFANCIA Y LA ADOLESCENCIA
- NUTRICIÓN APLICADA (PRESENCIAL)

[www.unav.es/fcdns](http://www.unav.es/fcdns)

#### OTROS ESTUDIOS DE NUTRICIÓN Y SALUD

- MÁSTER EUROPEO EN NUTRICIÓN Y METABOLISMO (E-MENU)
- CURSO DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA "DIETA EQUILIBRADA Y SALUD"

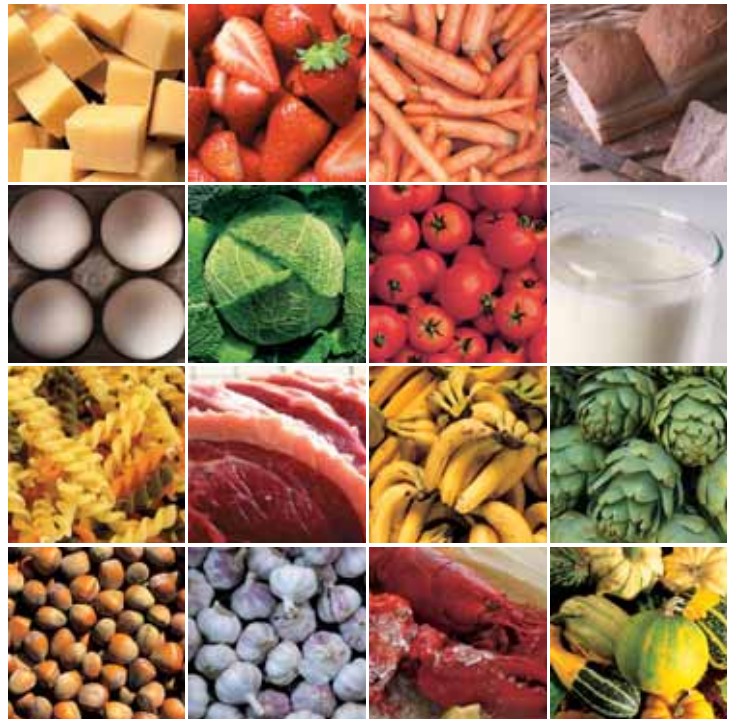
[www.unav.es/fcdns/extension](http://www.unav.es/fcdns/extension)

## INFÓRMATE

Instituto de Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Navarra (ICAUN).  
Edificio de Ciencias. Irúnlarrea, 1 - 31008 Pamplona. Navarra. España  
T +34 948 425 665 (directo) ó +34 948 425 600 (ext.6551/6432)  
F +34 948 425 649 | [www.unav.es/fcdns](http://www.unav.es/fcdns) | [nutdist@unav.es](mailto:nutdist@unav.es)



Universidad  
de Navarra



## Facultad de Farmacia

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN